

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 21 JUL 2004

WIPO

PCT

13 SEP 2004

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts BL61993PC	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/02611	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13.03.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 13.03.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/50		
Anmelder AXARON BIOSCIENCE AG et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 18 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

I Grundlage des Bescheids
II Priorität
III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
V Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
VI Bestimmte angeführte Unterlagen
VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 26.09.2003	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.07.2004
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Niebuhr-Ebel, K Tel. +49 89 2399-7814



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/02611

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der Bestandteile der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-82 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-47 in der ursprünglich eingereichten Fassung
48-60 eingegangen am 23.06.2004 mit Schreiben vom 22.06.2004

Zeichnungen, Blätter

1/25-25/25 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der Sprache: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blatt:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/02611

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung
- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-60 |
| | Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-60 |
| | Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-60 |
| | Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

V.1. Die vorliegende Anmeldung betrifft Verfahren zur Detektion und Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle.

Neuheit (Art. 33 (2) PCT)

V.2. Die Ansprüche 1-60 sind neu und erfüllen damit die Anforderungen des **Artikels 33(2) PCT**.

Erforderische Tätigkeit (Art. 33 (3) PCT)

V.3. Das in der Anmeldung offenbare Verfahren beruht auf dem Prinzip der andauernden Neugenerierung eines aktiven Reporterproteins, wodurch ein verstärktes, permanentes Signal entsteht. Es erlaubt den Nachweis dynamischer Vorgänge, wie dem Zustandekommen von Protein-Interaktionen, von transienten Interaktions-Vorgängen, aber auch von Protein-Dissoziationsvorgängen. Damit überwindet das erfindungsgemäße Verfahren wesentliche Nachteile des Standes der Technik. Eine erforderische Tätigkeit wird daher anerkannt. Die Ansprüche 1-60 erfüllen somit die Anforderungen des **Artikels 33(3) PCT**.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion und Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle umfassend die Verfahrensschritte
 - 5 a) Bereitstellen der Aktivität mindestens eines Enzyms aus der Gruppe der Rekombinasen und Proteasen in der Zelle als Folge einer Protein-Interaktion,
 - b) andauernde Generierung eines aktiven Reporterproteins in der betreffenden Zelle als Folge der Enzymaktivität aus Schritt a), für einen Zeitraum, der über die Dauer der Protein-Interaktion aus Schritt a) hinausgeht,
 - 10 c) Erzeugung eines Detektionssignals durch die in b) generierten Reporterproteine.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das aktive Reporterprotein in Verfahrensschritt b) in der betreffenden Zelle für einen solchen Zeitraum andauernd generiert wird, der die gesamte Lebensdauer der betreffenden Zelle umfaßt.
15
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Reporterprotein zusätzlich in den Tochterzellen der betreffenden Zelle derart generiert wird, dass die gesamte Lebensdauer der Tochterzellen umfasst wird.
20
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die andauernde Generierung des aktiven Reporterproteins nach Verfahrensschritt b) zu seiner Akkumulation in der betreffenden Zelle oder ihren Tochterzellen führt, wobei durch diese Akkumulation ein Detektionssignal erzeugt wird, welches gegenüber einem Detektionssignal verstärkt ist, das durch ein lediglich während der Dauer der Protein-Interaktion generiertes Reporterprotein erzeugt wurde.
25
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die zu detektierende oder zu analysierende Protein-Interaktion eine Stimulus-induzierte Protein-Interaktion transienter Natur ist.
30
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym aus Verfahrensschritt a) eine Rekombinase ist, deren Aktivität durch die Transfektion oder Infektion der Zelle mit dem Expressionsvektor i) bereitgestellt wird, welcher ein Rekombinase-Gen umfasst, das unter der Kontrolle eines Transkriptionsfaktors steht,
35 und daß die andauernde Generierung des aktiven Reporterproteins in der betreffenden Zelle nach Verfahrensschritt b) durch die Einzelschritte

- b1) Transfektion oder Infektion der Zelle mit einem Konstrukt ii), das eine von Rekombinationsstellen flankierte Stop-Kassette mit der nachgeschalteten Nukleotidsequenz eines Reporter-Gens unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters umfaßt,
- 5 b2) Entfernung der von Rekombinationsstellen flankierten Stop-Kassette des Konstruktes ii) mittels der Rekombinase aus a),
- b3) konstitutive Expression des Reporter-Gens,
erfolgt.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektionen oder Infektionen der Zelle stabil sind.
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektionen oder Infektionen der Zelle transient sind.
- 15 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Reporter-Gen ein Gen aus der Gruppe der fluoreszierenden Reporter-Gene, der Reporter-Gene mit enzymatischer Funktion, der Resistenz-vermittelnden Gene und der Reporter-Gene zur Wachstumsselektion eingesetzt wird.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Reporter-Gen das „green fluorescent protein“ (GFP), eine seiner Varianten, Luciferase oder β -Galaktosidase eingesetzt wird.
- 25 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym aus Verfahrensschritt a) eine Rekombinase ist, deren Aktivität durch die Protein-Interaktions-abhängige Transkomplementation einer funktionalen Rekombinase im Zellkern bereitgestellt wird,
und daß die andauernde Generierung des aktiven Reporterproteins in der betreffenden Zelle nach Verfahrensschritt b) durch die Einzelschritte
- 30
35 b4) Transfektion oder Infektion der Zelle mit einem Konstrukt ii), das eine von Rekombinationsstellen flankierte Stop-Kassette mit der nachgeschalteten Nukleotidsequenz eines Reporter-Gens unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters umfaßt,
- b5) Entfernung der von Rekombinationsstellen flankierten Stop-Kassette des Konstruktes ii) mittels der Rekombinase aus a),
- b6) konstitutive Expression des Reporter-Gens,
erfolgt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkomplementation der funktionalen Rekombinase durch die Schritte

5

d1) Expression eines ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und einen Teil der Rekombinase, und eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner und einen weiteren Teil der Rekombinase,

10 d2) Rekonstituierung einer funktionellen Rekombinase durch die Interaktion des ersten und des zweiten Interaktionspartners miteinander im Zellkern, erfolgt.

15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivitäten einer Protease und einer Rekombinase bereitgestellt werden und daß die Aktivität der Protease durch die Protein-Interaktions-abhängige Transkomplementation einer funktionalen Protease entsteht.

20 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkomplementation der funktionalen Protease durch die Schritte

e) Expression eines

25 e1) ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und einen Teil einer Protease, und

e2) eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner und einen weiteren Teil der Protease,

30 wobei gegebenenfalls mindestens eines der beiden Fusionsproteine eine weitere Domäne besitzt, die zur Verankerung des Fusionsproteins außerhalb des Zellkerns führt, und

35 e3) Expression einer funktionalen Rekombinase, welche gegebenenfalls eine weitere Domäne des ersten oder zweiten Fusionsproteins darstellt und von den übrigen Domänen durch eine Erkennungs- und Schnittstelle für die Protease proteolytisch abspaltbar ist, oder

Expression einer funktionalen Rekombinase auf einem dritten Fusionsprotein, welches neben der funktionalen Rekombinase selbst, die durch eine Erkennungs- und Schnittstelle für die Protease proteolytisch abspaltbar ist, eine weitere Domäne

umfaßt, die zur Verankerung des dritten Fusionsproteins außerhalb des Zellkerns führt,

in einer Zelle,

- 5 f) Rekonstituierung einer funktionalen Protease durch die Interaktion des ersten und des zweiten Interaktionspartners miteinander,
- g) proteolytisches Abspalten der funktionalen Rekombinase von seiner Verankerung außerhalb des Zellkerns durch die rekonstituierte Protease aus f),
- 10 h) Transport der funktionalen Rekombinase in den Zellkern und Aktivierung eines Rekombinase-abhängigen Reporter-Gens,
erfolgt.

15 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt e) als Komponente e3) eine funktionale Rekombinase exprimiert wird, welche mindestens eine weitere Domäne besitzt, die zur Verankerung der Rekombinase an der Zellmembran führt, und die in Schritt g) proteolytisch von ihrer Verankerung an der Zellmembran abgespalten wird.

20 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivitäten einer Protease und einer Rekombinase bereitgestellt werden, und daß eine Protein-Interaktions-vermittelte räumliche Proximität zwischen der Protease und ihrem Substrat erzeugt wird.

25 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität der Protease in der Zelle durch die räumliche Proximität zwischen der Protease und ihrem Substrat durch die Schritte

j) Expression eines

- 30 j1) ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und eine funktionale Protease, und
- j2) eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner, eine funktionale Rekombinase-Domäne und eine weitere Domäne, die zur Verankerung außerhalb des Zellkerns führt, wobei zumindest die funktionale Rekombinase-Domäne von der Domäne, welche zur Verankerung des zweiten Fusionsproteins außerhalb des Zellkerns führt, durch eine Erkennungs- und Schnittstelle der verwendeten Protease proteolytisch abspaltbar ist, in der Zelle,

- k) Bewirken einer aus der Interaktion des ersten und des zweiten Interaktionspartners resultierenden räumlichen Proximität zwischen der funktionalen Protease des ersten Fusionsproteins und der Protease-Erkennungs- und Schnittstelle auf dem zweiten Fusionsprotein,
- 5 l) proteolytisches Abspalten der außerhalb des Zellkerns verankerten funktionalen Rekombinase durch Spalten der Protease-Schnittstelle mit der proximalen Protease, Transport der freien funktionalen Rekombinase in den Zellkern und Aktivierung eines Reporter-Systems, erzeugt wird.
- 10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Reporterprotein aus Schritt b) in der betreffenden Zelle dadurch bereitgestellt wird, dass als unmittelbare oder mittelbare Folge der Protein-Interaktion ein spezifischer funktionaler Transkriptionsfaktor im Zellkern dieser Zelle bereitgestellt wird, der die Expression des besagten Reporterproteins induziert oder steigert.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der spezifische funktionale Transkriptionsfaktor im Zellkern der Zelle durch Protein-Interaktions-abhängige Transkplementation eines funktionalen Transkriptionsfaktors im Zellkern bereitgestellt wird.
- 20 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkplementation des funktionalen Transkriptionsfaktors die Schritte
- 25 m) Expression eines ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und einen Teil des Transkriptionsfaktors, und eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner und einen weiteren Teil des Transkriptionsfaktors,
- n) Rekonstituierung eines funktionellen Transkriptionsfaktors durch die Interaktion des ersten und des zweiten Interaktionspartners miteinander,
- 30 o) Induktion der Expression einer funktionalen Rekombinase zur Aktivierung einer Rekombinase-abhängigen Reporter-Systems im Zellkern, umfasst.
- 35 21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der funktionale Transkriptionsfaktor durch Protein-Interaktions-vermittelte Proximität zwischen einer Protease und ihrem Substrat bereitgestellt wird.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die räumliche Proximität zwischen der Protease und ihrem Substrat durch die Schritte

5 j) Expression eines

j1) ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und eine funktionale Protease, und

10 j2) eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner, eine funktionale Transkriptionsfaktor-Domäne und eine weitere Domäne, die zu einer Verankerung außerhalb des Zellkerns führt, wobei zumindest die funktionale Transkriptionsfaktor-Domäne von der Domäne, welche zur Verankerung des zweiten Fusionsproteins außerhalb des Zellkerns führt, durch eine Erkennungs- und Schnittstelle der verwendeten Protease proteolytisch abspaltbar ist,

15 in der Zelle,

20 k) Bewirken einer aus der Interaktion des ersten und des zweiten Interaktionspartners resultierenden räumlichen Proximität zwischen der funktionalen Protease des ersten Fusionsproteins und der Protease-Erkennungs- und Schnittstelle auf dem zweiten Fusionsprotein,

25 l) proteolytisches Abspalten des außerhalb des Zellkerns verankerten funktionalen Transkriptionsfaktors durch Spalten der Protease-Schnittstelle mit der proximalen Protease, Transport des freien funktionalen Transkriptionsfaktors in den Zellkern und Aktivierung eines Reporter-

30 Systems,

erzeugt wird.

23. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Transkriptionsfaktor durch die Protein-Interaktions-abhängige Transkomplementation einer Protease bereitgestellt wird.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkomplementation der Protease durch die Schritte

35 p) Expression eines

p1) ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und einen Teil einer Protease, und

p2) eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner und einen weiteren Teil der Protease,

wobei gegebenenfalls mindestens eines der beiden Fusionsproteine eine weitere Domäne besitzt, die zur Verankerung des Fusionsproteins außerhalb des Zellkerns führt, und

5

p3) Expression eines funktionalen Transkriptionsfaktors,

10 welcher gegebenenfalls eine weitere Domäne des ersten oder zweiten Fusionsproteins darstellt und von den übrigen Domänen des Fusionsproteins durch eine Erkennungs- und Schnittstelle für eine Protease proteolytisch abspaltbar ist, oder

15 Expression eines funktionalen Transkriptionsfaktors auf einem dritten Fusionsprotein, welches neben dem funktionalen Transkriptionsfaktor selbst, der durch eine Erkennungs- und Schnittstelle für die Protease proteolytisch abspaltbar ist, eine weitere Domäne umfaßt, die zur Verankerung des dritten Fusionsproteins außerhalb des Zellkerns führt;

in einer Zelle;

- 20 q) Rekonstituierung einer funktionalen Protease durch die Interaktion des ersten und des zweiten Interaktionspartners miteinander;
- r) proteolytisches Abspalten des funktionalen Transkriptionsfaktors von seiner Verankerung außerhalb des Zellkerns durch die rekonstituierte Protease aus
- 25 q)
- s) Bereitstellung eines funktionalen Transkriptionsfaktors im Zellkern und anschließende Induktion der Expression eines Rekombinase-abhängigen oder eines Rekombinase-unabhängigen, klassischen Reporter-Systems,

erreicht wird.

- 30 25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß der in Schritt r) proteolytisch abgespaltene funktionale Transkriptionsfaktor in Schritt s) im Zellkern zur Induktion der Expression eines Rekombinase-unabhängigen, klassischen Reporter-Systems führt und zusätzlich zur Induktion der Expression einer funktionalen Protease zur weiteren dauerhaften Aktivierung des eingesetzten Reporter-Systems führt.
- 35
26. Verfahren zur Detektion und Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle, umfassend die Schritte
- u) Expression eines

- 5 u1) ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und einen Teil einer Protease, und
- u2) eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner und einen weiteren Teil der Protease, und
- u3) eines durch Proteolyse aktivierbaren oder inaktivierbaren Reporters, in der Zelle,
- v) Rekonstituierung einer funktionalen Protease durch die Interaktion des ersten und des zweiten Interaktionspartners miteinander,
- w) Aktivierung des durch Proteolyse aktivierbaren oder Inaktivierung des durch Proteolyse inaktivierbaren Reporters durch die rekonstituierte funktionale Protease aus Schritt v).
- 10 27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt u) als Komponente u3) ein durch Proteolyse aktivierbares Reporterprotein exprimiert wird, dessen Reporteraktivität durch die Insertion einer zusätzlichen Aminosäuresequenz, die ein- oder beidseitig von mindestens einer Erkennungsstelle und/oder Schnittstelle für eine Protease flankiert ist, inaktiviert ist.
- 15 28. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt u) als Komponente u3) ein durch Proteolyse inaktivierbares Reporterprotein exprimiert wird, das mindestens eine Erkennungs- und Schnittstellen für eine Protease enthält und dessen Reporteraktivität proteolytisch inaktivierbar ist.
- 20 29. Verfahren zur Detektion und Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle, umfassend die Schritte
- x) Expression eines
- 30 x1) ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und eine funktionale Protease, und
- x2) eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner und einen durch Proteolyse aktivierbaren oder inaktivierbaren Reporter, in der Zelle;
- 35 y) Interaktion des ersten und des zweiten Interaktionspartners miteinander;
- z) Aktivierung des durch Proteolyse aktivierbaren Reporters oder Inaktivierung des durch Proteolyse inaktivierbaren Reporters durch die Protein-Interaktionsabhängige räumliche Proximität der funktionalen

Protease des ersten Fusionsproteins x1) und des durch Proteolyse aktivierbaren oder inaktivierbaren Reporter des zweiten Fusionsproteins x2).

5 30. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym aus Verfahrensschritt a) eine Protease ist und daß die andauernde Generierung des aktiven Reporterproteins in der betreffenden Zelle nach Verfahrensschritt b) durch die Einzelschritte

10 A) Expression eines

A1) ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und einen Teil einer Protease, und

A2) eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner und einen weiteren Teil der Protease, und

15 A3) einer Protease, die durch Proteolyse aktivierbar ist,

in der Zelle,

B) Transkomplementation einer funktionalen Protease durch die Interaktion des ersten und des zweiten Interaktionspartners miteinander,

C) Aktivierung der Proteasen, die proteolytisch aktivierbar sind, durch die transkompementierte funktionale Protease aus Schritt B),

20 D) Aktivierung oder Inaktivierung eines proteolytisch aktivierbaren oder eines proteolytisch inaktivierbaren Reporter-Systems durch die funktionalen Proteasen aus den Schritten B) und C),

erfolgt.

25 31. Verfahren zur Detektion und Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle, umfassend die Schritte

J) Expression eines

30 J1) ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und einen Teil einer Protease, und

J2) eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner und einen weiteren Teil der Protease, und

35 J3) konstitutive Expression eines über eine geeignete Domäne außerhalb des Zellkerns verankerten Reporter-Proteins, welches von dieser Verankerung proteolytisch abspaltbar ist, und zusätzlich eine weitere Domäne umfaßt, welche nach der proteolytischen Abspaltung die Lokalisation des Reporter-Proteins in ein bestimmtes Kompartiment der Zelle bewirkt,

- in der Zelle,
- K) Rekonstituierung einer funktionalen Protease durch die Interaktion des ersten und des zweiten Interaktionspartners miteinander,
- L) Proteolytisches Abspalten des Reporter-Proteins mitsamt seiner Domäne, die die Lokalisation des freien Reporter-Proteins in ein bestimmtes Kompartiment der Zelle bewirkt, durch die funktionale Protease aus Schritt K),
- M) Detektieren der veränderten Lokalisation des Reporter-Proteins.
- 10 32. Screening-Verfahren zur Identifizierung eines spezifischen Interaktionspartners eines definierten Proteins unter Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 31.
- 15 33. Screening-Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß zur Identifizierung eines spezifischen Interaktionspartners des definierten Proteins eine cDNA-Bibliothek oder eine ORF-Bibliothek exprimiert wird.
- 20 34. Screening-Verfahren nach einem der Ansprüche 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Identifizierung von Substanzen eingesetzt wird, die eine spezifische Protein-Interaktion beeinflussen, insbesondere inhibieren oder aktivieren.
- 25 35. Verfahren zur Detektion und Analyse der Dissoziation einer definierten Protein-Interaktion in einer Zelle umfassend die Verfahrensschritte
- P) Bereitstellung der Aktivität mindestens eines Enzyms aus der Gruppe der Rekombinasen und Proteasen in der Zelle als Folge der Dissoziation einer Protein-Interaktion,
- Q) andauernde Generierung eines aktiven Reporterproteins in der betreffenden Zelle als Folge der Enzymaktivität aus Schritt P) für einen Zeitraum, der über die Dauer des dissozierten Zustandes der Protein-Interaktion hinausgeht,
- R) Erzeugung eines Detektionssignals durch die in Q) generierten Reporterproteine.
- 35 36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß das aktive Reporterprotein in Verfahrensschritt Q) für einen solchen Zeitraum andauernd generiert wird, der die gesamte Lebensdauer der betreffenden Zelle umfasst.

37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß das aktive Reporterprotein in Verfahrensschritt Q) zusätzlich in den Tochterzellen der betreffenden Zelle derart generiert wird, daß die gesamte Lebensdauer der Tochterzellen umfasst wird.

5

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die andauernde Generierung des aktiven Reporterproteins nach Verfahrensschritt Q) zur Akkumulation des aktiven Reporterproteins in der betreffenden Zelle oder ihren Tochterzellen führt, wobei durch diese Akkumulation ein Detektionssignal erzeugt wird, welches gegenüber einem solchen Detektionssignal verstärkt ist, welches gegenüber einem Detektionssignal verstärkt ist, das durch ein lediglich während der Dauer der Dissoziation der Protein-Interaktion erzeugt wurde.

10

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß die zu detektierende oder zu analysierende Dissoziation einer Protein-Interaktion eine Stimulus-induzierte Dissoziation transienter Natur ist.

15

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß die Dissoziation der Protein-Interaktion durch mindestens eines der Ereignisse ausgewählt aus
der Gegenwart eines spezifischen Inhibitors der Protein-Interaktion, und
der Gegenwart eines Stimulus, der die Protein-Interaktion beeinflußt,
verursacht wird.

20

25 41. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym aus Verfahrensschritt P) eine Rekombinase ist, und daß die andauernde Generierung des aktiven Reporterproteins in der betreffenden Zelle nach Verfahrensschritt Q) durch die Einzelschritte

30

S) Expression und spezifische Interaktion

S1) eines ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und eine funktionale Rekombinase, und

S2) eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner und einen Inhibitor der Rekombinase.

35

in der Zelle,

T) induzierte Dissoziation der interagierenden Fusionsproteine und dadurch Aufhebung der Proximität zwischen der Rekombinase und ihrem Inhibitor und Bereitstellung einer funktionalen Rekombinase,

U) Aktivierung eines Rekombinase-abhängigen Reportersystems durch die funktionale Rekombinase aus Schritt T), erfolgt.

5 42. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym aus Verfahrensschritt P) eine Rekombinase ist, und daß die andauernde Generierung des aktiven Reporterproteins in der betreffenden Zelle nach Verfahrensschritt Q) dadurch erfolgt, daß als Folge der Dissoziation der definierten Protein-Interaktion ein spezifischer funktionaler Transkriptionsfaktor im Zellkern dieser Zelle bereitgestellt wird, welcher die Expression einer Rekombinase induziert oder steigert, wobei diese Rekombinase anschließend ein Rekombinase-abhängiges Reporter-Gen aktiviert.

15 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß die andauernde Generierung des aktiven Reporterproteins in der betreffenden Zelle nach Verfahrensschritt Q) durch die Schritte

V) Expression und spezifische Interaktion eines

- 20 V1) ersten Fusionsproteins, umfassend den ersten Interaktionspartner und eine funktionale Protease und
V2) eines zweiten Fusionsproteins, umfassend den zweiten Interaktionspartner und einen Inhibitor für die funktionale Protease, und

25 wobei gegebenenfalls mindestens eines der beiden Fusionsproteine eine weitere Domäne besitzt, die zur Verankerung des Fusionsproteins außerhalb des Zellkerns führt, und

30 V3) Expression eines funktionalen Proteins ausgewählt aus der Gruppe der Transkriptionsfaktoren, Rekombinasen und proteolytisch aktivierbare oder inaktivierbare Reporter-Proteine,

welches gegebenenfalls eine weitere Domäne des ersten oder zweiten Fusionsproteins darstellt und von den übrigen Domänen durch eine Erkennungs- und Schnittstelle für die Protease proteolytisch abspaltbar ist,

35 oder welches gegebenenfalls ein weiteres konstitutiv exprimierte Fusionsprotein darstellt und eine Domäne zur Verankerung außerhalb des Zellkerns und durch eine Erkennung- und Schnittstelle für die Protease von seiner Verankerung proteolytisch abspaltbar ist

V4) gegebenenfalls Expression einer proteolytisch aktivierbaren Protease,

in der Zelle,

- W) induzierte Dissoziation der interagierenden Fusionsproteine, dadurch Aufhebung der Proximität zwischen der Protease und ihrem Inhibitor und Bereitstellung einer funktionalen Protease,
5 X) proteolytisches Abspalten der funktionalen Rekombinase oder des funktionalen Transkriptionsfaktors aus V3) von seiner Veranketung außerhalb des Zellkerns durch die funktionale Protease aus Schritt W) und Transport in den Zellkern,
10 Y) Aktivierung eines Rekombinase-abhängigen Reporter-Systems oder proteolytische Aktivierung der proteolytisch aktivierbaren Protease aus V4) durch die funktionale Protease aus Schritt W),
Z) Aktivierung oder Inaktivierung der proteolytisch aktivierbaren oder inaktivierbaren Reporterproteine aus V3) durch die funktionalen Proteasen
15 aus Schritt W) und aus Schritt Y),
erfolgt.

44. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt V) als funktionales Protein V3) ein funktionaler, von seiner Verankerung außerhalb des Zellkerns proteolytisch abspaltbarer Transkriptionsfaktor exprimiert wird, der in Schritt X) durch die funktionale Protease aus Schritt W) proteolytisch abgespalten wird und der in Schritt Y) ein Rekombinase-abhängiges Reporter-System aktiviert.

45. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt V) als weiteres funktionales Protein V3) eine funktionale, von ihrer Verankerung außerhalb des Zellkerns proteolytisch abspaltbare Rekombinase exprimiert wird, die in Schritt X) durch die funktionale Protease aus Schritt W) von ihrer Verankerung abgespalten wird und die in Schritt Y) ein Rekombinase-abhängiges Reporter-Gen aktiviert.

46. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt V) als funktionales Protein V3) ein proteolytisch aktivierbares oder inaktivierbares Reporterprotein exprimiert wird und daß die proteolytisch aktivierbare Protease V4) exprimiert wird, welche in Schritt Y) durch die funktionale Protease aus Schritt W) proteolytisch aktiviert wird und welche in Schritt Z) ein proteolytisch aktivierbares oder inaktivierbares Reporter-Protein aktivieren oder inaktivieren.

47. Screening-Verfahren zur Identifikation oder Charakterisierung von spezifischen Inhibitoren oder Aktivatoren einer definierten Protein-Interaktion oder zur

Identifikation oder Charakterisierung eines definierten Stimulus, der eine definierte Protein-Interaktion beeinflußt, unter Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 35 bis 46.

- 5 48. Zelle, die mit mindestens einem Expressionsvektor transfiziert oder infiziert wurde, wobei der Expressionsvektor mindestens eine, vorzugsweise mindestens zwei, insbesondere mindestens drei der Konstrukte i) bis v) umfaßt, und wobei
- 10 i) ein Konstrukt, umfassend eine außerhalb des Zellkerns verankerte Rekombinase, welche proteolytisch abspaltbar ist,
- ii) ein Konstrukt, umfassend einen außerhalb des Zellkerns verankerten Transkriptionsfaktor, welcher proteolytisch abspaltbar ist,
- iii) ein Konstrukt, umfassend ein proteolytisch aktivierbares oder inaktivierbares Reporter-Protein,
- iv) ein Konstrukt, umfassend eine proteolytisch aktivierbare Protease,
- 15 v) ein Protease-Gen, welches unter der Kontrolle eines Transkriptionsfaktors steht,
ist.
49. Zelle, die mit mindestens einem Expressionsvektor transfiziert oder infiziert wurde, wobei der Expressionsvektor mindestens eines der Konstrukte i) bis ii) umfasst, und zusätzlich mindestens eines, vorzugsweise mindestens zwei, insbesondere mindestens drei der Konstrukte iii) bis vii) umfasst, und wobei
- 20 i) ein Konstrukt umfassend ein Rekombinase-Gen, welches unter der Kontrolle eines Transkriptionsfaktors steht,
- 25 ii) ein Konstrukt das eine von Rekombinationsstellen flankierte Stop-Kassette mit der nachgeschalteten Nukleotidsequenz eines Reporter-Gens unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors umfasst,
- iii) ein Konstrukt, umfassend eine außerhalb des Zellkerns verankerte Rekombinase, welche proteolytisch abspaltbar ist,
- 30 iv) ein Konstrukt, umfassend einen außerhalb des Zellkerns verankerten Transkriptionsfaktor, welcher proteolytisch abspaltbar ist,
- v) ein Konstrukt, umfassend ein proteolytisch aktivierbares oder inaktivierbares Reporter-Protein,
- vi) ein Konstrukt, umfassend eine proteolytisch aktivierbare Protease,
- 35 vii) ein Protease-Gen, welches unter der Kontrolle eines Transkriptionsfaktors steht,
ist.

50. Zelle nach Anspruch 48 oder 49, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle stabil transfiziert oder infiziert wurde.

5 51. Zelle nach Anspruch 48 oder 49, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle transient transfiziert oder infiziert wurde.

10 52. Zelle nach einem der Ansprüche 48 bis 51, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Zelle auswählt aus der Gruppe Bakterienzelle, Hefezelle oder Zellen höherer Eukaryonten, insbesondere um neuronale Zellen oder Säugerzelllinien, handelt.

15 53. Kit zur Detektion und zur Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle umfassend Expressionsvektoren, die die Nukleinsäurekonstrukte 1a) und 2a) jeweils unter der Transkriptionskontrolle eines heterologen Promoters umfassen:

15 1a) ein erstes Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein erstes Fusionsprotein, umfassend die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein erstes Proteasefragment und eine Klonierungsstelle, die sich zur Einklonierung des Körner-Proteins im Leseraster des ersten Proteasefragments eignet, und

20 2a) ein zweites Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein zweites Fusionsprotein, umfassend die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein zweites Proteasefragment und eine Klonierungsstelle, die sich zur Einklonierung des Beute-Proteins im Leseraster des zweiten Proteasefragments eignet,

25 und gegebenenfalls umfassend Expressionsvektoren, die mindestens eines der folgenden Konstrukte umfassen:

30 3a) Nukleinsäurekonstrukt kodierend für eine funktionale Rekombinase oder für einen funktionalen Transkriptionsfaktor, der von einer Domäne zur Verankerung an einer zytoplasmatischen Struktur durch eine Erkennungs- und Schnittstelle für eine Protease proteolytisch abspaltbar ist, wobei diese Komponenten entweder als weitere Anteile des ersten oder zweiten Fusionsproteins oder als eigenständiges drittes Fusionsprotein eingesetzt werden können;

35 4a) ein Nukleinsäurekonstrukt kodierend für eine Rekombinase, die unter der Kontrolle des funktionalen Transkriptionsfaktors aus Nr. 3. steht;

5a) ein Nukleinsäurekonstrukt, das eine von Erkennungsstellen für Rekombinasen flankierte Stop-Kassette mit der nachgeschalteten Nukleotidsequenz eines Reporter-Gens unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters umfaßt;

- 6a) ein Nukleinssäurekonstrukt kodierend für ein proteolytisch aktivierbares oder proteolytisch inaktivierbares Reporter-Protein unter der Kontrolle eines Promoters;
- 7a) ein Nukleinsäurekonstrukt kodierend für eine proteolytisch aktivierbare Protease unter der Kontrolle eines Promoters.

5 54. Kit zur Detektion und zur Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle umfassend Expressionsvektoren, die die Nukleinsäurekonstrukte 1b) und 2b) jeweils unter des Transkriptionskontrolle eines heterologen Promotors umfassen:

- 10 1b) ein erstes Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein erstes Fusionsprotein, umfassend die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine funktionale Protease und eine Klonierungsstelle, die sich zur Einklonierung des ersten Interaktionspartners im Leseraster der funktionalen Protease eignet, und

- 15 2b) ein zweites Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein zweites Fusionsprotein, umfassend

die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein ausgewählt aus der Gruppe der Rekombinasen, Transkriptionsfaktoren und Reporter-Proteine, eine Klonierungsstelle, die sich zur Einklonierung des zweiten Interaktionspartners im Leseraster des Proteins eignet,

20 und gegebenenfalls eine Nukleinsäuresequenz, die im Leseraster des Proteins für eine Proteindomäne kodiert, die zur Verankerung des zweiten Fusionsproteins außerhalb des Zellkerns führt,

25 und gegebenenfalls umfassend Expressionsvektoren, die mindestens eines der Konstrukte umfassen

- 3b) ein Konstrukt zur Expression eines Rekombinase-Gens, welches unter der Kontrolle des funktionalen Transkriptionsfaktors aus Nr. 2. steht;

- 30 4b) ein Konstrukt, das eine von Erkennungsstellen für Rekombinasen flankierte Stop-Kassette mit der nachgeschalteten Nukleotidsequenz eines Reporter-Gens unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters umfaßt, umfassen.

35 55. Kit zur Detektion und zur Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle umfassend Expressionsvektoren, die mindestens eines der Nukleinsäurekonstrukte 1c) und 2c) jeweils unter des Transkriptionskontrolle eines heterologen Promotors umfassen:

- 1c) ein erstes Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein erstes Fusionsprotein, umfassend die Nukleinsäuresequenz kodierend für einen ersten Teil eines Proteins ausgewählt aus der Gruppe der Transkriptionsfaktoren oder Rekombinasen und eine Klonierungsstelle, die sich zur Einklonierung des ersten Interaktionspartners im Leseraster des Proteins eignet,
- 5
2c) ein zweites Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein zweites Fusionsprotein, umfassend die Nukleinsäuresequenz kodierend für einen zweiten Teil eines Proteins ausgewählt aus der Gruppe der Transkriptionsfaktoren oder Rekombinasen und eine Klonierungsstelle, die sich zur Einklonierung des zweiten Interaktionspartners im Leseraster des Proteins eignet,
- 10

und gegebenenfalls umfassend Expressionsvektoren, die mindestens eines der folgenden Konstrukte umfassen:

- 15
3c) ein Konstrukt zur Expression eines Rekombinase-Gens, welches unter der Kontrolle des funktionalen, transkomplementierten Proteins aus Nr. 1 und 2 steht, wobei dieses Protein ein Transkriptionsfaktor ist;
- 4c) ein Konstrukt, das eine von Erkennungsstellen für Rekombinasen flankierte Stop-Kassette mit der nachgeschalteten Nukleotidsequenz eines Reporter-Gens unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters umfaßt.
- 20
56. Kit zur Detektion und zur Analyse von Protein-Interaktionen in einer Zelle umfassend mindestens einen Expressionsvektor, der mindestens eines der Nukleinsäurekonstrukte 1d) und 2d) jeweils unter der Transkriptionskontrolle eines heterologen Promotors umfasst:
- 25
1d) ein erstes Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein erstes Fusionsprotein umfassend ein funktionales Enzym aus der Gruppe der Proteasen oder Rekombinasen und ein Köder-Protein, und
- 30
2d) ein zweites Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein ein zweites Fusionsprotein umfassend einen funktionalen Inhibitor für ein Enzym aus der Gruppe der Proteasen und Rekombinasen und ein Beute-Protein.
- 35
57. Kit nach einem der Ansprüche 53 bis 55, dadurch gekennzeichnet, daß in die Klonierungsstelle des zweiten Fusionsproteins nach 2a), 2b) und 2c) eine cDNA-

Bibliothek zum Screening nach Interaktionspartnern des Köder-Proteins einkloniert ist.

5 58. Kit nach einem der Ansprüche 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Zellen auswählt aus der Gruppe Bakterienzelle, Hefezelle oder Zellen höherer Eukaryonten, insbesondere neuronale Zellen oder Säugerzelllinien, bereitgestellt werden, die sich mit den in Anspruch 53 bis 56 definierten Expressionsvektoren transfizieren oder infizieren lassen.

10 59. Kit nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, daß die zusätzlich bereitgestellten Zellen mit mindestens einem der in Anspruch 53 bis 55 definierten Expressionsvektoren transfiziert oder infiziert sind, und daß lediglich die in Anspruch 53 bis 56 definierten Expressionsvektoren, mit denen die Zellen nicht transfiziert oder infiziert sind, zusätzlich in Form von Expressionsplasmiden bereitgestellt werden.

15 60. Verwendung mindestens eines Enzyms aus der Gruppe der Rekombinasen und Proteasen oder mindestens eines Expressionsvektors, der ein solches Enzym kodiert, zur andauernden Generation eines aktiven Reporterproteins in einer Zelle für einen Zeitraum, der über die Dauer der Protein-Interaktion hinausgeht.